

AC

SCREENING METHOD FOR REGULATING SUBSTANCE OF IN VIVO OXIDATION STRESS

Patent number: JP2003270243
Publication date: 2003-09-25
Inventor: KOYAMA NAOTO; KURIBAYASHI KANNA; SUZUKI HIROMI
Applicant: AJINOMOTO KK
Classification:
- international: G01N33/50; A61K31/095; A61K31/352; A61K31/355; A61K45/00; A61P39/06; G01N33/15
- european:
Application number: JP20020070650 20020314
Priority number(s): JP20020070650 20020314

Report a data error here

Abstract of JP2003270243

<P>PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for efficiently selecting a substance used to prevent, reduce or remove a bad effect generated when an oxidation stress is applied to a specific in vivo tissue. <P>SOLUTION: In a screening method for a regulating substance of an in vivo oxidation stress, the oxidizability of various tissues sampled from an experimental animal orally dosed with a specimen is measured so as to be compared with the oxidizability of various tissues of a reference animal not dosed with the specimen, and the specimen is screened. <P>COPYRIGHT: (C)2003,JPO

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

AC

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-270243

(P2003-270243A)

(43) 公開日 平成15年9月25日 (2003.9.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/095		A 6 1 K 31/095	4 C 0 8 4
31/352		31/352	4 C 0 8 6
31/355		31/355	4 C 2 0 6
45/00		45/00	

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-70650 (P2002-70650)

(22) 出願日 平成14年3月14日 (2002.3.14)

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 小山 直人

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社健康基盤研究所内

(72) 発明者 栗林 かな

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社健康基盤研究所内

(74) 代理人 100080791

弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 生体内の特定の組織に酸化ストレスがかかることによって生じる弊害を予防、軽減、あるいは除去し得る物質を効率的に選抜するための方法の提供。

【解決手段】 被験物質を経口投与した実験動物から採材した各種組織の被酸化性を測定し、被験物質を投与しない対照動物の各種組織の被酸化性と比較して被験物質のスクリーニングを行うことを特徴とする生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体内組織の被酸化性を測定し、その変化を指標としてスクリーニングすることを特徴とする、生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法。

【請求項2】 被験物質を経口投与した実験動物から採材した各種組織の被酸化性を測定し、被験物質を投与しない対照動物の各種組織の被酸化性と比較して被験物質のスクリーニングを行うことを特徴とする請求項1記載の生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法。

【請求項3】 前記の被酸化性の測定が、緩衝液中でホモゲナイズされた各種組織の希釈液に酸化剤を添加し、該酸化剤による酸化物の生成を経時的に測定する方法であることを特徴とする請求項1または2記載の生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法。

【請求項4】 各種組織の被酸化性の比較を、酸化物生成量を経時的にプロットして作成した酸化物生成曲線の曲線下面積値によって行う、請求項1または2記載のスクリーニング方法。

【請求項5】 被験物質の曲線下面積値が対照動物の曲線下面積値を100とする相対値である請求項4記載のスクリーニング方法。

【請求項6】 測定された生体内組織の被酸化性を数値化し、各種組織の被酸化性を該数値により一覧としたパネルを作成し、該パネル上の数値の比較によりスクリーニングすることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項記載の生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法。

【請求項7】 被酸化性の数値が、酸化物生成量を経時的にプロットして作成した酸化物生成曲線の曲線下面積値である請求項6記載のスクリーニング方法。

【請求項8】 被験物質の曲線下面積値が対照動物の曲線下面積値を100とする相対値である請求項7記載のスクリーニング方法。

【請求項9】 パネルが、縦または横欄のいずれか一方に被験物質名を、また他方に該物質を摂取させた動物から採材した各種組織名を配置し、各組織ごとの被酸化性の数値を該当セル中表示したパネルである請求項6～8のいずれか1項記載のスクリーニング方法。

【請求項10】 縦または横欄のいずれか一方に被験物質名を、また他方に該物質を摂取させた動物から採材した各種組織名を配置し、請求項1～4のいずれか1項記載のスクリーニング方法で得られた被酸化性の数値を該当セル中表示したパネル。

【請求項11】 被酸化性の数値が、酸化物生成量を経時的にプロットして作成した酸化物生成曲線の曲線下面積値である請求項10記載のパネル。

【請求項12】 被験物質の曲線下面積値が対照動物の曲線下面積値を100とする相対値である請求項11記載のパネル。

【請求項13】 各項目と数値の大小の傾向を色分けし

て着色した請求項10～12のいずれか1項記載のパネル。

【請求項14】 請求項1～9のいずれか1項記載の方法によりスクリーニングされた生体内酸化ストレス調節物質を含有する特定生体組織の酸化ストレス調節剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は生体内の特定の組織に酸化ストレスがかかることによって生じる弊害を予防、軽減、あるいは除去し得る物質を効率的に選抜するための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、糖尿病およびその合併症、高血圧、動脈硬化性疾患、アルツハイマー病など、生活習慣病をはじめとする数多くの疾患の成立、発症、進展などのプロセスに、生体内に過剰の活性酸素（窒素）種が生じることにより生じる酸化ストレスが関与していることが明らかとなってきた。生体内で発生した酸化ストレスは、通常、生体組織中にもともと存在する（＝内因性の）抗酸化物質や抗酸化酵素などによって速やかに消去されるのが普通であるが、酸化ストレスが過剰に強い局面においては、内因性抗酸化物質が枯渇するなど、生体の抗酸化システムの破綻が生じる結果生み出される組織障害が上記諸疾患の原因（の一つ）になるものと考えられている（'Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd edition', Halliwell and Gutteridge (Ed.), Oxford, pp617-783, 1999）。そのため、生体内酸化ストレスを予防、あるいは緩和すると考えられる物質の投与・摂取が健康の維持・各種疾病の予防・治療などに重要と考えられるようになってきた。例えば、LDL（低比重リポタンパク）が生体内で酸化されることが初期の動脈硬化巣の形成に重要な役割を果たすことが知られているが、赤ワイン（中の抗酸化物質）の摂取により血中のLDLが酸化されにくくなる（＝被酸化性が抑制される）ことが報告されている。このことは心臓病のリスクファクターと考えられている乳脂肪の摂取率の高さの割には心臓病による死亡率が低いというフランス国民における逆説（“フレンチパラドックス”）を説明し得るものと考えられている（Kondoら、Lancet, 344: pp1152, 1994）。

【0003】酸化ストレスの原因になると考えられるほとんどの活性酸素種は極めて短命であること、生体内酸化ストレスは本来極めて局所的な事象と考えられること、また、脂質過酸化などの酸化障害反応が非常に速く進行することなどを考慮すると、生体内酸化ストレスを予防・緩和する目的で摂取される物質は、酸化ストレスが生じる局所に効率的に運ばれ、予めその局所における被酸化性を直接／間接的に抑制し得る（＝酸化抵抗性を向上させる）ものであることが望ましい。しかしながら、経口的に摂取された機能成分の吸収性、代謝・排泄特性、組織への到達性、生体内における活性発現のメカ

ニズムなどに関する知見がまだまだ乏しい現在、どのような物質が目的とする組織においてその被酸化性を調節し得るのか予測することは極めて難しい(U.Cornellら, J.Natr., 131:pp3208-3211, 2001)。被験物質の酸化ストレス調節能を知るには、酸化ストレスを誘起することが知られている薬物を投与した実験動物、あるいは酸化ストレスに起因する疾病を自然発症するモデル動物、外科的に一部の血管を結索した実験動物、あるいは抗酸化ビタミン類を除いた餌で飼育した実験動物など、酸化ストレスを負荷した実験動物に被験物質を投与した後、各組織を採取して実際に生じた酸化障害を調査する方法が一般的に行われている。しかし、これらの方法は、疾病モデル動物が高価であること、酸化ストレスを誘起できる対象臓器が限られること、特殊な手技を要すること、あるいは、ビタミン欠乏が顕在化するのに時間を要すること、などの点で必ずしも満足のいくものではなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、酸化ストレスが関与すると考えられる特定の疾患・健康状態を、経口的摂取により予防・改善・治療する目的に好適な物質、あるいは、特定組織の酸化ストレスに強く影響する物質のより効率的な選抜及び評価に有用な方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、動物に経口的に摂取させた物質が宿主組織の被酸化性(＝酸化され易さ)に及ぼす影響をin vitroで鋭敏に検出する手段を見出し、また、検出した組織被酸化性に係る結果を数値化して対照群(コントロール)のものと比較することにより、摂取させた物質が個々の組織の被酸化性に及ぼす影響を簡便に表示する手段を確立した。すなわち、本発明は、以下の項目を包含する。

【0006】(1) 生体内組織の被酸化性を測定し、その変化を指標としてスクリーニングすることの特徴とする、生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法。

(2) 被験物質を経口投与した実験動物から採材した各種組織の被酸化性を測定し、被験物質を投与しない対照動物の各種組織の被酸化性と比較して被験物質のスクリーニングを行うことを特徴とする上記(1)記載の生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法。

(3) 前記の被酸化性の測定が、緩衝液中でホモゲナイズされた各種組織の希釈液に酸化剤を添加し、該酸化剤による酸化物の生成を経時的に測定する方法であることを特徴とする上記(1)または(2)記載の生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法。

(4) 各種組織の被酸化性の比較を、酸化物生成量を経時的にプロットして作成した酸化物生成曲線の曲線下面

積値によって行う、上記(1)または(2)記載のスクリーニング方法。

(5) 被験物質の曲線下面積値が対照動物の曲線下面積値を100とする相対値である上記(4)記載のスクリーニング方法。

(6) 測定された生体内組織の被酸化性を数値化し、各種組織の被酸化性を該数値により一覧としたパネルを作成し、該パネル上の数値の比較によりスクリーニングすることの特徴とする上記(1)～(5)のいずれか1記載の生体内酸化ストレス調節物質のスクリーニング方法。

(7) 被酸化性の数値が、酸化物生成量を経時的にプロットして作成した酸化物生成曲線の曲線下面積値である上記(6)記載のスクリーニング方法。

(8) 被験物質の曲線下面積値が対照動物の曲線下面積値を100とする相対値である上記(7)記載のスクリーニング方法。

(9) パネルが、縦または横欄のいずれか一方に被験物質名を、また他方に該物質を摂取させた動物から採材した各種組織名を配置し、各組織ごとの被酸化性の数値を該当セル中表示したパネルである上記(6)～(8)のいずれか1記載のスクリーニング方法。

(10) 縦または横欄のいずれか一方に被験物質名を、また他方に該物質を摂取させた動物から採材した各種組織名を配置し、上記(1)～(4)のいずれか1記載のスクリーニング方法で得られた被酸化性の数値を該当セル中表示したパネル。

(11) 被酸化性の数値が、酸化物生成量を経時的にプロットして作成した酸化物生成曲線の曲線下面積値である上記(10)記載のパネル。

(12) 被験物質の曲線下面積値が対照動物の曲線下面積値を100とする相対値である上記(11)記載のパネル。

(13) 各項目と数値の大小の傾向を色分けして着色した上記(10)～(12)のいずれか1記載のパネル。

(14) 上記(1)～(9)のいずれか1の方法によりスクリーニングされた生体内酸化ストレス調節物質を含有する特定生体組織の酸化ストレス調節剤。上記のとおり、本発明は、生体内組織の被酸化性の高感度な測定方法を見出したこと、また、この方法を用いて測定した組織被酸化性を数値化して対照群に対する相対値で表すことにより、経口的に摂取された物質が各組織の被酸化性に及ぼす影響を実質的に一つの数値によって表示し、これらの各組織の被酸化性に係る数値をパネルに表示して、被験物質が各組織の被酸化性に及ぼす影響を簡便に識別し得るようにしたことを特徴とする。

【0007】

【発明の実施の形態】実験動物： 実験動物は、マウス、ラットなどの小動物から、犬、猿などの大型動物まで、いかなる種類でも使用可能である。

被験物質： 生体内酸化ストレス調節物質としては、食品中の抗酸化物質として知られる各種の物質のほか、高脂血症治療剤として知られる物質、あるいは、抗酸化物質としての作用が未だ知られていない既存・新規の物質など、いかなるものも含まれる。例えば、 α -トコフェロールに代表されるビタミンE同族体やビタミンC、ビタミンB₂、及びその他の各種ビタミン類、 α -リポ酸、N-アセチル-L-システイン、 γ -グルタミルシステインなどのチオール化合物、ケルセチン、カテキン、セサミンなどの植物由来の各種ポリフェノール・リグナン類、 β -カロチン、リコペン、ルテインなどの植物色素類、カルノシン、ヒスチジンなどの抗酸化性ペプチド・アミノ酸類、また、高脂血症治療剤として知られるプロブコールなど、降圧剤として知られるカプトプリルなどが挙げられる。

組織被酸化性の測定方法： 血中LDL（低比重リポタンパク）などの被酸化性の測定法としては、例えばEsterbauerら（Free Rad. Res. Comms., 6, pp67, 1989）や、近藤らが開示した方法（J. Nutr. Sci. Vitaminol., 43, pp435, 1997）などが適用できる。また、肝や腎など、その他の臓器については、通常10%（w/v）前後の臓器ホモジェネートに種々の酸化剤を添加し、一定温度でインキュベートすることによって一定時間内に生成してくる過酸化物の量を測定することが一般的である（Kangら、J. Nutr., 128, pp1018, 1998、Tsudaら、Lipids, 33, pp583, 1998、Burczynskiら、Free Rad. Biol. Med., 26, pp987, 1999）。

【0008】本発明で用いる組織はいずれの動物由来組織でもよく、例えば、肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓、脾臓、脳、副腎、胃、大腸、小腸、血管、各種骨格筋、網膜、神経、皮膚、骨髄、生殖腺などが挙げられる。組織ホモジェネートの調製には生理食塩水や一般的に用いられる各種緩衝液、例えば、リン酸緩衝液、Tris塩酸緩衝液などが使用される。組織ホモジェネートの調製には、組織片に対して上記の緩衝液を適当量加えて、ポリロンなどの一般的な破碎機を用いて破碎する。この際、組織片1部に対して緩衝液の量は4~499部（組織ホモジェネート濃度=0.2~20%（w/v））でよく、特に19~99部（組織ホモジェネート濃度=1~5%（w/v））の使用量が好ましい結果を与える。次に、こうして調製した組織ホモジェネートに酸化剤を添加しin vitroで酸化させるのであるが、酸化剤としては、銅や鉄などの遷移金属、あるいはそれらとアスコルビン酸、過酸化水素などとの組み合わせ、もしくは各種のラジカル放出剤などが使用可能であり、特にAAPH（2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride）の使用が好ましい結果を与える。酸化反応をモニターするための指標としては、脂質ペルオキシド、アルデヒド類、タンパク中のカルボニル残基、8OH-dGなどの核酸酸化物、ニトロ化アミノ酸などが適用可能であるが、とりわけTBA反応陽性物質（チオバ

ルビツール酸反応陽性物質：TBARS）が簡便さ、感度などの点で好ましい。

【0009】以下に、酸化剤としてAAPHを使用する方法について詳述する。AAPHの組織ホモジェネートへの至適添加量は、組織ホモジェネートの濃度により変化するため一義的には決められないが、通常0.2~20 mM程度であり、例えば、2%（w/v）の組織ホモジェネートであれば、終濃度2 mM前後となるように添加する場合に特に好ましい結果が得られる。酸化剤を組織ホモジェネートに添加し、約25~42℃、好ましくは30~40℃で30分~6時間程度保温する。37℃付近で2時間程度の保温がとくに好ましく、その間に発生するラジカルにより組織ホモジェネート中に過酸化物が蓄積してくるため、酸化剤添加直前のものも含めて、酸化反応終了までの間に数回サンプリングして過酸化物の量を測定する。サンプリング回数は多いほどよいが、測定に用いることのできる試料の量に応じて加減するとよい。TBARSの検出手段としては、大川らが開示した方法（Ohkawaら、Anal. Biochem., 95, pp351, 1979）が適用可能であるが、この方法に限定されるものではない。通常、TBARSの定量は、試料（生成したTBARSをブタノールで抽出したもの）、およびマロンジアルデヒドなどの標準物質の535 nm前後の吸光度を分光光度計で測定することによって達成されるが、組織によってTBARSの生成量が異なるため、蛍光測定のような、更に高感度の測定手段が必要となる場合がある。その場合は、例えば、励起波長=515 nm、蛍光波長=553 nmにて試料の蛍光強度を測定するとよい。

【0010】について、試験管内で組織ホモジェネートを強制的に酸化させることによって生じるTBARS量を組織ホモジェネートのタンパク含量で除した数値（nmole/mg；タンパクあたりのTBARS生成量）を算出し、横軸の保温時間に対して縦軸にタンパクあたりのTBARS生成量をプロットするとTBARS生成曲線（酸化物生成曲線）が得られる。被酸化性の亢進した（=酸化抵抗性の低い）組織ホモジェネートを用いると、一般的により多くのTBARSが生成し、被酸化性が抑制された（=酸化抵抗性が高い）組織ホモジェネートを用いると、一般的により少ないTBARSしか生成しない。上記測定条件は、こうした組織被酸化性の差を特にTBARS生成曲線に反映し易くするうえで有利である。

【0011】酸化物生成曲線： 被酸化性の異なる複数の組織ホモジェネートを用いて得られるTBARS生成曲線を比較することによって、酸化剤添加直前のTBARS値、酸化剤添加後のTBARS生成速度、最終的なTBARS蓄積レベルなど、組織の種類による被酸化性の様々な相違や特徴を見出すことができる。いずれの特徴も生体内外における組織被酸化性の違いを反映する指標として捉えることが可能であるが、どの指標を選ぶかによって、組織被酸化性の差に表現の違いが生じる可能性がある。これらの指標全てを用いて生体内酸化ストレス調節物質の影響を

一元的に表すことは困難であったが、本発明者らは、TBARS生成曲線によって示されるこれらの相違や特徴を一元的に表示できるような指標を見出した。

【0012】すなわち、上記した測定方法によって得られた各組織ホモジネートの測定値に基づいてTBARS生成曲線を作成し、各TBARS生成曲線の曲線下面積（AUC）を計測すれば、同数値は被酸化性の様々な特徴を一元的に表示する指標となり得るから、各組織の被酸化性の差をAUCの差として把握することが可能となる。また、酸化ストレス調節物質非投与群（対照群）のAUC（平均値）を100とする相対値で酸化ストレス調節物質摂取群のAUC（平均値）を表すことによって、各酸化ストレス調節物質の被酸化性へ与える影響の大きさを簡便に対比することが可能であり、この場合、100より小さい数値は対照群に比べて組織被酸化性が抑制される（＝酸化抵抗性が増した）方向での変化を、逆に100よりも大きい数値は組織被酸化性が亢進する（＝酸化抵抗性が減少した）方向での変化を意味する。

【0013】パネルの作成：更に、縦・横の欄のいずれか一方に摂取させた生体内酸化ストレス調節物質を、また他方に該物質を摂取させた動物から採材した各種組織（臓器）を配置したパネル中にこれらの相対AUC値を表示することにより、どのような物質の摂取がどの組織の被酸化性の調節に有効であるのか、また、どの組織が特定の物質に対する感受性が高いのか、などを容易に知ることが可能である。すなわち、本発明のパネルを利用すれば、特定組織の被酸化性を有効に抑制する酸化スト

レス調節物質を簡便に知ることができ、また、逆に、特定組織に影響を与えやすい酸化ストレス調節物質を簡便に知ることができる。したがって、本発明のパネルは、疾病と関連する特定組織の被酸化性を抑制するための治療・予防薬の開発に有効に利用可能であるほか、動物実験あるいは試験管内試験において、特定組織の被酸化性を抑制あるいは亢進させるための試薬の選抜に有効に利用することができる。また、適当な統計処理を施した結果対照群との間に有意差が認められた部分について、各相対AUC値あるいはそれらが配置された欄（セル）の色などに反映させ、パネル中の各セルを段階的に色分けするなどの着色をすれば、被験物質の効果の有無をより簡便に識別し易くすることができる。例えば、各相対AUC値の有意差検定によって求めた危険率にしたがって、被酸化性抑制側及び亢進側にそれぞれ3段階に分けて色分け表示する。

【0014】本発明が、実際に生体内酸化ストレス調節物質の特徴づけや選抜に有効なツールであることを以下の実施例で明らかにするが、本発明は、これらの記載によって限定されるものではない。

【0015】

【実施例】C57BL/6マウス（8～9週齢、♂）を1群6～7匹の6群とし、1週間の予備飼育後、各群ごとに、水、および表1に示す成分組成の餌を2週間自由摂取させた。

【0016】

【表1】

群	試料組成	
対照	普通食（20% カゼイン、66.3% コーンスターチ、5% コーンオイル、4% ミネラル混合物、1% ビタミン混合物、0.2% 塩化コリン、4% セルロース粉末）	
α-トコフェロール	普通食+0.2%* α-トコフェロール	*コーンスターチでバランス
α-リポ酸	普通食+0.02%* α-リポ酸	*コーンスターチでバランス
プロボコール	普通食+0.67%* プロボコール	*コーンスターチでバランス
カプトプリル	普通食+0.07%* カプトプリル	*コーンスターチでバランス
ケルセチン	普通食+0.67%* ケルセチン2水和物	*コーンスターチでバランス

【0017】その後剖検前夜から絶食させたマウスより各種組織（肝、腎、脾、心、肺、骨格筋、血液）を採材し、脱血、生理食塩水で洗浄後、直ちに液体窒素で瞬間凍結させた。凍結組織の一部をその49倍量の冷リン酸緩衝液（PBS）中でホモゲナイズし、タンパク含量を測定した（BCAプロテインアッセイキット、ピアース社）。組織ホモジェネートのタンパク含量は約3 mg/mlにあわせた後、以下に述べるin vitro 酸化実験に供した。各組織ホモジェネートに1/20容の40 mM AAPHを添加し、37℃水浴中で酸化させた。5 mM BHT（butylated hydroxytoluene）10μlと8.1% SDS（sodium dodecylsulfate）50μlを予め分注しておいたTBARS反応用ねじ口試験管に経時的に（0、60、120、270 min）反応混液から50μlを採取しよく混和した。こうしてサンプリングした各試料に、375μlの20%酢酸バッファー（pH3.5）と、375μlのTBA試薬（0.8% チオバルビツール酸水溶液）を添加

し、沸騰水中で60分加温した。室温付近まで冷却した後、250μlの蒸留水を添加し、1,250μlのn-ブタノール／ピリジン混液（15:1）を加えてよく混合した。遠心分離（3,000 rpm、10分、室温）により層分離させ、上層（n-ブタノール層）の吸光度（535 nm）を分光光度計（ベックマン・コールター社 DU-640）で、ホモジェネートの量が少ない、あるいは肉眼でほとんど発色が認められないような希薄試料の場合は、蛍光強度を蛍光光度計（励起波長＝515 nm、蛍光波長＝553 nm；島津製作所 RF-1500）を用いて測定した。上記と同じ操作を施したTEP（1,1,3,3-tetraethoxypropane）をTBARSスタンダードとし、作成した検量線からサンプル中のTBARS濃度を求め、nmole / mgタンパクで表した。各測定には常に対照群を入れることにより、測定間誤差を吸収できるようにした。

【0018】横軸に反応時間を、縦軸にTBARS濃度をプ

ロットすることによって図1の酸化物生成曲線が得られた。これらの曲線下面積(AUC)を計算し、対照群のAUCを100とした時の相対AUC値を各投与群ごとに求めた。これらの値を、縦の欄に摂取させた物質を横の欄に組織の

種類を配置したパネルに表示した(表2)。

【0019】

【表2】

抗酸化物質	飼料中濃度	投与日数	肝臓	腎臓	脾臓	肺	心臓	大腿二頭筋	大動脈
対照			100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
αリポ酸	0.02%	7-14	93.0	91.8	86.9	72.9**	81.1	116.8	ND
α-トコフェロール	0.2-0.5%	7-14	60.0**	94.5	77.8*	52.1**	58.3**	80.3	88.5
ケルセチン	0.67%	14	72.8**	113.5	140.8**	82.8**	105.4	124.8	ND
プロブコール	0.67%	14	54.2**	87.8	121.3	51.2**	52.8**	90.3	ND
カプトプリル	0.07%	14	71.1**	102.7	127.4**	56.3**	79.1	88.3	ND

(各数字は対照を100とした時の被酸化性相対値)

低い ← 組織被酸化性 → 高い

ND=Not Determined

** P<0.01 * P<0.05 + P<0.05 ++ P<0.01 Dunnet Post hoc test

【0020】表2によれば、α-トコフェロールが調べた全ての組織においてその被酸化性を抑制する傾向を示すこと、高脂血症治療薬であるプロブコールが特定の組織(肝、心、肺)においてとりわけ強く被酸化性を抑制すること、一方、タマネギ中に含まれる代表的なフラボノイドであるケルセチンが腎、および脾における被酸化性を亢進することなどを容易に知ることができる。該パネルは、各相対AUC値の有意差検定によって求めた危険率にしたがって、被酸化性抑制側及び亢進側にそれぞれ1~3段階に分けて色分け表示することによって、各組織の被酸化性の傾向をより明りょうに識別しやすいものとする事ができる。

【0021】

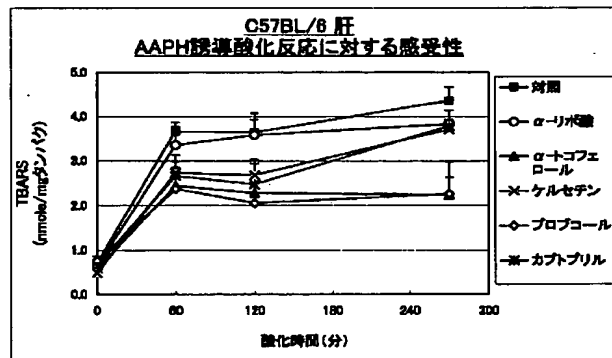
【発明の効果】本発明は、生体内ストレス調節物質が各

組織の被酸化性に与える影響を高感度に測定することが可能なスクリーニング方法を提供し、また、その測定値から対照群に対する相対値を算出してパネルに表示したことによって、生体内ストレス調節物質が各組織の被酸化性に及ぼす影響を簡便に知りえるものとした。したがって、本発明は、疾病と関連する特定組織の被酸化性を抑制するための治療・予防薬の開発に有用であるほか、動物実験あるいは試験管内試験において、特定組織の被酸化性を抑制あるいは亢進させるための試薬の選抜手段として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】AAPHにより誘導されたマウスの肝臓ホモジネート酸化反応における酸化物生成曲線を示す。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. 7

A 6 1 P 39/06

G 0 1 N 33/15

識別記号

F I

A 6 1 P 39/06

G 0 1 N 33/15

メモード(参考)

Z

!(7) 003-270243 (P2003-043

(72)発明者 鈴木 裕美
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社アミノサイエンス研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA29 AA40 BA13 BB16 BB41
CA25 CB01 CB17 DA80 GC10
GC15 JA01 JA04
4C084 AA17 ZC21
4C086 AA10 BA08 BA09 NA14 ZC21
4C206 AA10 JA32 NA14 ZC21